

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝性くる病における特異な遺伝様式の解明とビタミン D 受容体変異の多様性に関する分子細胞生物学的研究

氏名 田村 麻由子

【序文】

骨の成長には、血中カルシウム濃度が適切に維持されることが必要であり、そのためにビタミン D シグナルが重要な役割を果たす。ビタミン D の作用が障害されると、小児では骨の成長に異常が生じ、くる病が引き起こされる。くる病とは、小児におけるカルシウムやリンの不足による骨基質の石灰化不全を指し、低身長、歩行障害、骨の変形、低カルシウム血症などの症状を呈する。くる病の原因としては、ビタミン D 欠乏症が大部分を占めるが、これとは別に遺伝性のくる病が存在する。ビタミン D シグナル経路の異常による遺伝性くる病は、 1α 水酸化酵素の異常により発症するビタミン D 依存性くる病 I 型 と、ビタミン D 受容体 (Vitamin D receptor: VDR) の異常により発症するビタミン D 依存性くる病 II 型 (Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets: HVDRR) に分けられる。このうち HVDRR では、くる病症状に加え、禿頭を伴う場合がある。VDR は、核内転写因子の一つで、DNA 結合領域 (DNA binding domain: DBD)、リガンド結合領域 (Ligand binding domain: LBD) から成る。VDR は活性型ビタミン D と結合し、核内に移行する。さらに、レチノイド X レセプター (RXR) とのヘテロ二量体を形成し、コファクターの制御を受けながら標的遺伝子のビタミン D 応答配列に結合し転写を活性化する因子として働く。

HVDRR は常染色体劣性遺伝形式をとり、両親がともに保因者である場合にその子供に発症するケースが大部分を占める。しかし劣性遺伝性疾患であっても、保因者が片親のみで子に発症するケースが存在する。片親のアレルの遺伝子異常により劣性遺伝性疾患が発症する機序として、片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD) が挙げられる。UPD とは、一对の相同染色体がその全長もしくは部分的に、片方の親から受け継いだもののみで成る状態のことを指す。UPD の大部分は、インプリンティング疾患で見つかったが、UPD による劣性遺伝性疾患の報告数は限られている。UPD の診断は、従来は Short tandem repeat (STR) 解析により行われてきたが、部分的な UPD の場合に検出が難しい。そこで近年、ゲノムワイド Single nucleotide polymorphism (SNP) アレイ解析に注目が集まっている。

HVDRR を引き起こす VDR 異常はこれまでに約 50 種類報告されているが、HVDRR は発生頻度が低いために、VDR の変異の多様性や、VDR の変異と機能異常、HVDRR の臨床症状の関係は十分に理解されていない。しかし、HVDRR の病態は軽症から重症までさまざまであるため、患者ごとに最適な治療方針を確立することが望まれる。本研究では、

臨床的に HVDRR と診断された患者 8 名に対して、遺伝子変異点を同定するとともに、特異な遺伝形式を呈した患者 1 名について、SNP 解析、STR 解析、および SNP アレイ解析を行い、その特殊な遺伝形式を明らかにした。さらに、同定した変異のタンパク質機能を、転写活性化能、リガンド結合能、コファクターや RXR との相互作用能、核内移行能について解析し、機能障害を評価した。以上をもとに VDR の変異とタンパク質機能変化、表現型の違いを分類、比較し、希少疾患 HVDRR の VDR 遺伝子変異の多様性について検討を行った。

【対象と方法】

患者

日本人 1 名、トルコ人 7 名の 8 名の患者が、くる病と禿頭の臨床症状を示し、HVDRR と診断された。

VDR 遺伝子解析

患者 8 名およびその父母について、末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法およびサンガーシーケンス法を用いて VDR 遺伝子の塩基配列を解読した。

遺伝形式が非典型的である患者に対する解析

非典型的な遺伝形式が他の遺伝子、染色体部位でも起こっているのかを検証するため SNP 解析および STR 解析、更に、ゲノムワイド SNP アレイ解析を行った。

変異 VDR のタンパク質機能解析

同定した変異が疾患の原因となりうることを検証するため、ルシフェラーゼアッセイにより VDR の転写活性化能を解析した。また VDR の機能がどのように障害されているかを探るべく、放射性同位体標識したリガンドを用いてリガンド結合能を解析するとともに、哺乳類細胞によるツーハイブリッドアッセイ法を用い VDR とコアクチベーター (SRC-1)、コリプレッサー (NCoR)、RXR との相互作用を解析した。また、蛍光標識 VDR を用いて細胞内における局在を解析した。

【結果】

新規変異を含む VDR 変異の同定

HVDRR 患者 8 名に対する VDR 遺伝子解析にて、二つの既報変異 (R73X、Q152X) および三つの新規変異を同定した。新規変異は、S360P という LBD のミスセンス変異、DBD の一塩基挿入によるフレームシフト変異、イントロン 8 の一塩基置換によるスプライスサイト変異であった。ただし、新規ミスセンス変異である S360P は *in silico* 解析の結果、疾患原因となる可能性は低いというものであった。患者 2~8 の両親は、それぞれの変異をヘテロに有する保因者であった。しかし、患者 1 については、母のみ保因者であり、父には変異が同定されなかった。

UPD による HVDRR の発症の証明

SNP 解析および STR 解析の結果、患者 1 の SNP および STR マーカーは 12 番染色体において、母由来アレルの homozygote であることが示唆された。12 番染色体以外では、父母より由来していた。12 番染色体の母由来 UPD による発症を疑い、SNP アレイ解析を行った。すると、父母のすべての染色体および患者の 12 番染色体以外の染色体ではホモア

レル、ヘテロアレルが均等に分布していた。これに対し、患者 12 番染色体はヘテロの SNP がなく、Loss of heterozygosity (LOH) の状態であった。さらに、患者の 12 番染色体において母由来と断定できる SNP は全長に分布しているのに対し、父由来と断定できるものは一つもなかった。すなわち 12 番染色体の complete maternal isodisomy であることが示された。

変異 VDR のタンパク質機能解析

In silico モデルでの結果と臨床所見に乖離が見られた患者 2 の S360P と、既報の変異 (Q152X, V346M, R274L, H305Q) について変異による VDR 機能への影響を解析した。まず、S360P では他の既報変異と同様に転写活性化能が低下しており、疾患原因となりうる変異であることが示された。リガンド結合能を解析したところ、V346M ではある程度リガンド結合能が保たれていたのに対し、S360P ではリガンド結合能が失われていた。コファクターである SRC-1 および NCoR との相互作用は、S360P において低下していた。また、VDR とヘテロ二量体を形成する RXR α について、禿頭を呈する S360P と V346M ではリガンド非存在下での相互作用が低下していたのに対し、禿頭を伴わない R274L と H305Q では相互作用は保たれていた。

さらに、変異 VDR の細胞内における動態を解析した。野生型の VDR ではリガンド非存在下でもある程度核内に局在し、リガンド存在下で核局在が増強された。これに対し、S360P ではリガンド非存在下において核局在が極めて弱く、リガンド存在下でも増強はされなかった。一方で、V346M は、リガンド非存在下での核局在はごく弱いものの、リガンド結合能が部分的に残存するため、リガンド存在下では核局在が増強した。リガンド結合のない Q152X と Q400LfsX7 ではリガンド非存在下での核局在は野生型と同等で、リガンド存在下での増強は見られなかった。

【考察】

本研究では、極めて希少な疾患である HVDRR の患者 8 名より、既報変異二つ、新規変異三つの変異を同定した。また、特異な遺伝形式を呈した一家系について、SNP アレイ解析を用いることで、これまでに報告のない UPD による HVDRR の発症を証明した。

新規に同定した S360P 変異はタンパク質全長の変化を伴わず、LBD における単純なミスセンス変異であり、*in silico* 解析でも機能障害を起こさないと予測された。360 番目のセリン残基は、RXR 結合部の他はどの機能ドメインにも近接していない。しかし、*in vitro* における機能解析の結果、S360P 変異 VDR は転写活性化能、リガンド結合能、コファクターとの相互作用能、核移行能が失われていることが明らかとなり、この実験結果は患者 2 が禿頭を呈する HVDRR でビタミン D 治療に抵抗性を示したことと一致した。非同義置換 S360P が、多岐にわたるタンパク質機能障害を示した機序としてヘリックス 9 のほぼ中央に存在するセリンが、環状アミンであるプロリンに置き換わることでヘリックス 9 の構造を大きく変化させ、これがタンパク質構造全体に影響を及ぼした可能性が考えられる。

禿頭は HVDRR の大きな特徴の一つである。VDR が毛包周期においてなんらかの機能を持っていると考えられており、その機能は、リガンド結合に依存しないと報告されてい

る。今回の実験で、禿頭を伴わないVDR変異(R274L、H305Q)は、リガンド非存在下でRXR α との相互作用能を有し、さらにDNA結合能を有していた。これに対し、禿頭を伴う変異(S360P、V346M)はリガンド非存在下でRXR α と相互作用せず、DNA結合能も低下していた。これらの結果は、これまでの報告とも一致するものであり、VDR/RXRのヘテロダイマーがDNA結合能を有していることが発毛におけるVDRの機能において必要不可欠であると考えられた。

また、SNPアレイを用いたことで、1度の解析でLOHを確認することができ、親の解析結果と合わせることで母由来UPDであることまで示すことができた。この患者においては遺伝様式を同定したことにより両親に対して将来の次子についての正確な遺伝カウンセリングが可能となった。さらにこの患者においてはR73XというLBDを欠く変異が起こっているという遺伝子解析の結果に基づき、それまでの活性型ビタミンD投与を中止し、Ca投与による治療に変更した結果、くる病の改善を得ることができ、この患者に適した治療法に変更することができた。

このように、HVDRRの患者において、個別の患者の変異を同定し、変異ごとの機能的特徴を知ることで、それぞれの患者に即した治療法確立することにつながるができる。さらには、くる病や骨形成疾患の新しい治療ターゲットを同定することや、骨形成だけにとどまらず、毛包など他の組織におけるVDRの機能の解明にも発展してゆくことが期待できる。